

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUDIANA CARDOSO DA SILVA

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA EM MELANÓCITOS
MURINOS B16F10



CURITIBA

2014

LUDIANA CARDOSO DA SILVA

EFEITOS DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA EM MELANÓCITOS
MURINOS B16F10

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina Bmed006 – Trabalho de Conclusão de Curso II como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Coorientador: Me. Samuel Liebel

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que me capacitou e me deu a oportunidade de chegar até aqui, por ter realizado em minha trajetória sonhos muito maiores do que os que eu mesma tive.

A minha mãe Eulina Martins, meu pai Edson Cardoso e demais familiares, que sempre acreditaram no meu potencial, pelo suporte e amor incondicional.

As minhas amigas Bruna Jacomel, Letícia Macohin, Melyssa Kmecick e Valéria Mendes, que compartilharam comigo todos os momentos importantes durante o curso, por terem sido companheiras fiéis e dividirem comigo as alegrias e os fardos durante esta jornada.

A Roselaine e Jorge Kmecick, que sempre abriram as portas do seu lar para mim e me acolheram como uma filha, pelas diversas vezes em que encurtaram meu percurso entre a casa e a universidade.

Ao meu orientador, Dr. Francisco Filipak Neto, que considero um exemplo de profissional, por contribuir para minha formação com cada uma de suas instruções, sempre feitas com disposição e paciência durante esses anos.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Celular, que me proporcionaram uma agradável experiência de iniciação científica. Em especial, ao meu coorientador, Me. Samuel Liebel, por me ensinar a dar os primeiros passos na minha carreira científica e ter me amparado desde então.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica - CME/Universidade Federal do Paraná, onde foram reproduzidas as imagens das nanopartículas.

RESUMO

A nanotecnologia é uma ciência em expansão. Dentre as suas aplicações, destaca-se o uso de nanopartículas (NPs) de ouro e prata. As propriedades das NPs favorecem a adsorção ou complexação com outros compostos e o carregamento destes para dentro das células, o que as tornam interessantes para aplicações na área biomédica. Faltam estudos sobre o impacto das NPs no ambiente e na saúde, e pouco se sabe a respeito dos seus efeitos sobre células cancerosas. O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo, devido à alta capacidade metastática. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar os efeitos das NPs de ouro e prata, visando reconhecer possíveis efeitos sobre a malignidade de melanócitos murinos B16F10. As células B16F10 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%, transferidas para microplacas de cultura de 96 poços e expostas por 24 h às NPs. Foram estabelecidos 12 grupos experimentais, sendo eles: 5 concentrações para ambas NPs (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 ng.mL⁻¹), um controle (contendo H₂O – veículo das NPs), e um controle negativo (saponina). As NPs utilizadas foram sintetizadas por ablação a laser e caracterizadas através das análises de UV-VIS, espalhamento dinâmico de luz - DLS, potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão. Após a exposição, foram realizados ensaios de viabilidade celular (vermelho neutro), metabolismo celular (MTT), análise da atividade dos transportadores de efluxo de drogas (MDR) e proliferação celular (cristal violeta). O potencial zeta das NP estava entre -20 e -22 mv, o que indica certa instabilidade das partículas dispersas nas soluções utilizadas. Entretanto, as partículas apresentaram-se com tamanho entre 1 a 4 nm, sem formação de grandes aglomerados. Como resposta à exposição, as células apresentaram aumento na viabilidade celular e no metabolismo mitocondrial. Entretanto, a taxa de proliferação celular sofreu redução. Ambas NPs, em todas as concentrações, reduziram a atividade dos transportadores de efluxo de drogas.

Palavras chaves: nanopartículas, melanoma, viabilidade, proliferação, resistência a múltiplas drogas.

ABSTRACT

Nanotechnology is an expanding science. The properties of NPs favor adsorption and complexation with other compounds which favor their uptake into the cells, making NPs interesting for applications in biomedicine. There are few studies about the impact of NPs on the environment and health, and little is known about NPs effects on cancer cells. Melanoma is the most aggressive type of skin cancer due to high metastatic capacity. The current work, therefore, aimed to investigate the effects of gold and silver NPs on B16F10 (murine melanocytes) cells. B16F10 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), transferred to 96-well microplates and exposed for 24 h to NPs. A total of 12 experimental groups were established: 5 for different concentrations of both NPs (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 ng.mL⁻¹), a control (containing H₂O, vehicle of NPs), and a negative control (saponin). NPs used were synthesized by laser ablation method and characterized by UV-VIS, dynamic light scattering - DLS, zeta potential and transmission electron microscopy. After exposure, cell viability (neutral red), metabolism (MTT) and proliferation (crystal violet) as well as activity of efflux drugs transporters (MDR) were determined. NP's zeta potential was -20 to -22 mV, which indicates certain degree instability of particles dispersion. However, NPs presented size from 1 to 4 nm without formation of large agglomerates. Cell viability and metabolism increased whereas proliferation rate and MDR activity decreased after exposure to both NPs.

Keywords: nanoparticles, melanoma, viability, proliferation, multidrug resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia de células da linhagem B16F10	14
Figura 2 - Esquema da montagem utilizada para realização da ablação a laser.....	18
Figura 3 - Banda SPR típica de Ag-NPs esféricas	19
Figura 4 - Espectro de absorção UV/Vis da amostra de AuNP e AgNP em água.....	26
Figura 5 - DLS de uma amostra de AuNPs e AgNP	26
Figura 6 – MET das nanopartículas de amostras de AuNP e AgNP	28
Figura 7 - Gráficos exibindo interferência das NPs detectadas sobre os métodos de CV, Atividade dos Transportadores de Efluxo, MTT e VN.....	30
Figura 8 - Viabilidade celular após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP	31
Figura 9 - Metabolismo mitocondrial após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP	33
Figura 10 - Atividade dos transportadores de efluxo de drogas após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP	34
Figura 11 - Proliferação celular após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – *ATP-binding cassette*

AgNP – Nanopartícula de prata

AuNP – Nanopartícula de ouro

CV – Cristal violeta

DLS – *Dynamic light scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

GSH – Glutathione

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MDR – *Multi Drug Resistance* (resistência a múltiplas drogas)

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MRP – *Multidrug Resistance-associated Protein* (Proteína de resistência a múltiplas drogas)

MTT – brometo de 3-metil [4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5 difeniltetrazólio

MXR – *Multi xenobiotic resistance* (resistência a múltiplos xenobióticos)

NP – Nanopartícula

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido dismutase

UV-Vis – Espectroscopia Ultravioleta e Visível

VN – Vermelho Neutro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1 NANOPARTÍCULAS.....	9
2.1.1 Nanopartículas de ouro (AuNP)	10
2.1.2 Nanopartículas de prata (AgNP)	11
2.2 MELANOMA.....	12
2.2.1 Linhagem de células B16F10	13
3 PERGUNTA	14
4 HIPÓTESE	14
5 JUSTIFICATIVA.....	15
6 OBJETIVO GERAL.....	15
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS.....	16
7 MATERIAL E MÉTODOS	16
7.1 CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM B16F10.....	16
7.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	17
7.2.1 Síntese das nanopartículas	17
7.2.2 UV-Vis	18
7.2.3 Espalhamento dinâmico de Luz – DLS.....	19
7.2.4 Potencial zeta.....	19
7.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão	20
7.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	20
7.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	20
7.4.1 Vermelho neutro	20
7.4.2 Azul de tripan	21
7.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE / METABOLISMO MITOCONDRIAL - MTT.....	22
7.6 ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES DO SISTEMA DE RESISTÊNCIA A MULTIPLAS DROGAS (MDR).....	23
7.7 PROLIFERAÇÃO CELULAR - CRISTAL VIOLETA.....	23
7.8 TESTE DE INTERFERÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS SOBRE OS ENSAIOS	24
7.9 ANÁLISE DOS DADOS.....	25
8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
8.1 CARATERIZAÇÃO DAS NPs.....	25
8.1.1 Aparência das nanopartículas	25

8.1.2 UV-Vis	25
8.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS	26
8.1.4 Potencial Zeta	27
8.1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	27
8.2 TESTE DE INTERFERÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS SOBRE OS ENSAIOS	29
8.3 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR	31
8.3.1 Vermelho neutro	31
8.3.2 Azul de tripan	32
8.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE / METABOLISMO MITOCONDRIAL – MTT	33
8.5 ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO	34
8.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR	35
8.7 NANOPARTÍCULAS E O MELANOMA	37
9 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Em meados de 2005 os primeiros produtos compostos por nanomateriais começaram a ser comercializados. Desde então, o mercado nanotecnológico tem se expandido de forma exponencial e ampliando suas aplicações para as mais diversas áreas (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2014). Contudo, há pouco conhecimento a respeito do potencial tóxico destas partículas, tão pouco dos seus efeitos crônicos no meio ambiente e nos organismos vivos, e devido a isto, as nanopartículas dentre outros contaminantes emergentes não são contempladas em legislações ambientais ao redor do mundo.

A exposição a substâncias desconhecidas pode representar um grande risco para a saúde e o ambiente. Além disso, o desconhecimento da ação destas substâncias sobre o quadro de pacientes já enfermos e a possibilidade destas perturbarem a dinâmica do tratamento pode se tornar um fator agravante. Tendo em vista este problema, este trabalho buscou avaliar se a exposição a nanopartículas de ouro e prata causam algum efeito sobre a malignidade de célula de melanoma.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOPARTÍCULAS

Nanopartícula (NP) é por definição, uma subclassificação de partícula ultrafina com comprimentos em duas ou três dimensões superior a 1 nanômetro e menor que 100 nanômetros, e podem apresentar propriedades específicas relacionados ao seu tamanho (ASTM *International*, 2006).

Nanopartículas são formadas espontaneamente na natureza como produtos da combustão incompleta de combustíveis fósseis e erupção vulcânica (NOWACK e BUCHELI, 2007). No entanto, nas duas últimas décadas elas vêm sendo produzidas industrialmente e em larga escala, graças ao desenvolvimento da nanotecnologia (EPA, 2007).

Desde 2006, o número de produtos registrados contendo nanomateriais cresceu cerca de 520%. Os Estados Unidos são o maior fabricante destes produtos nanotecnológicos, seguido pela Europa e a Ásia (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2014). Estima-se que na China mais de 1.000 toneladas de nanopartículas metálicas foram produzidas entre 2012-2013 (GAO *et al.*, 2013).

Há uma grande variedade de nanopartículas (NPs) sendo desenvolvidas e aplicadas. Estas aplicações vão desde a indústria eletrônica, passando pela cosmética e têxtil, até a biomédica que por sua vez, tem levantado a possibilidade do emprego das nanopartículas de ouro (AuNP) e prata (AgNP), tanto no diagnóstico quanto no tratamento do câncer (GRANMAYEH RAD; ABBASI; AFZALI, 2011; RAVINDRAN; CHANDRAN; KHA, 2013).

Contudo, o comportamento destas NPs em sistemas biológicos ainda não é totalmente esclarecido. Os primeiros trabalhos enfatizando a nanotoxicologia surgiram a partir do ano de 2004 (WEB OF SCIENCE, 2014) e por ser um tema recente, os efeitos crônicos das nanopartículas sobre a saúde humana e ambiental são desconhecidos. O que se sabe é que a mesma propriedade que as tornam úteis tem o potencial para as tornarem tóxicas. As nanopartículas são capazes de atravessar a barreira da membrana plasmática por endocitose. Além disso, suas propriedades físico-químicas permitem complexação com outros compostos, que podem eventualmente ser carregados para o interior celular (REJMAN *et al.*, 2004).

Tendo em vista o aumento da produção e utilização destas NP, é preocupante e inevitável que resíduos nanotecnológicos sejam encontrados no meio ambiente, expondo os humanos, além dos demais seres vivos, à esta nova classe de contaminantes emergentes.

2.1.1 Nanopartículas de ouro (AuNP)

O uso de soluções coloidais de ouro são datadas desde o século 5 a.C., no Egito e China, onde eram administradas para tratamento de doenças e fins estéticos. Na idade média essas soluções eram receitadas para tratamento do sistema digestivo, doenças sexualmente transmissíveis e tumores (BRUNDLE; EVANS; WILSON, 1992)

Tradicionalmente o ouro é classificado como um metal estável, considerado biocompatível e resistente a oxidação. Tem gerado grandes expectativas quanto as possíveis aplicações biomédicas das suas nanopartículas - biosensores, antimicrobianos, agentes de purificação de água contaminada por mercúrio, veículo de entrega de drogas e até mesmo ferramenta no diagnóstico e combate de doenças como HIV e câncer são apenas algumas das apostas nas AuNP (GRANMAYEH RAD; ABBASI; AFZALI, 2011). Porém, é importante considerar que as propriedades de um material em macroescala podem ser bem distintas de quando este se apresenta em nanoescala, além da superfície das nanopartículas estar sujeita a sofrer interações no ambiente celular.

Existem alguns estudos que apontam para o potencial tóxico das AuNPs, como Pan *et al.* (2007), que a fim de verificarem a citotoxicidade das AuNPs, avaliaram a exposição de quatro linhagens de células (dentre elas, as células de melanoma SK-Mel-28). Foram utilizadas AuNPs de 0,8 a 15 nm, de 1,4 nm causaram a morte celular por necrose dentro de 12 h e partículas de 1,2 nm provocaram a morte celular por apoptose, relacionando as respostas celulares ao tamanho das nanopartículas.

Estas AuNPs podem ser obtidas através de vários métodos. Os mais comuns se dão através de processos termolíticos e fotoquímicos, como reações químicas (geração de nanopartículas de ouro em um meio aquoso utilizando citrato ou boro hidreto de sódio como agente redutor, por exemplo), ablação a laser ou até mesmo por métodos biológicos que utilizam fungos e bactérias como uma alternativa ao uso de solventes orgânicos (KHAN; VISHAKANTE; SIDDARAMAIAH, 2013).

2.1.2 Nanopartículas de prata (AgNP)

As AgNPs se sobressaem em relação ao número de produtos disponíveis no mercado, seguidas pelas NP de carbono, titânio, sílica e ouro (THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2014). Há mais de 1500 produtos nanotecnológicos sendo comercializados e as nanopartículas de prata (AgNP) correspondem a 25% destes.

As AgNP também se destacam por sua atividade antimicrobiana. Na China é esperado um aumento na demanda pela produção destas de até 366 toneladas em 2014 em comparação com 45 toneladas em 2008, somente para esta finalidade (GAO *et al.*, 2013). Mas as AgNPs não se limitam a este fim; elas estão presentes em eletrônicos, eletrodomésticos, cosméticos, embalagens de alimentos, roupas esportivas, brinquedos, dispositivos médicos, produtos de limpeza etc.

Com tantas aplicações, a preocupação com seus efeitos no organismo faz-se presente. Estudos *in vitro* demonstraram que células expostas a AgNP apresentaram alterações morfológicas, sinais claros de estresse oxidativo (redução de níveis de glutathione (GSH) e atividade da superóxido dismutase (SOD)), bem como o aumento da peroxidação lipídica, além de fragmentação de DNA, sendo detectada apoptose inclusive em grupos expostos às concentrações baixas (ARORA; JAIN; RAJWADE, 2008; LIU *et al.* 2010).

O impacto das AgNPs nos ecossistemas aquáticos também tem recebido atenção. Colman *et al.* (2014) verificaram que os efeitos de AgNP em plantas aquáticas foram tão tóxicos quanto os da prata iônica (Ag⁺), um contaminante preocupante já conhecido.

2.2 MELANOMA

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer ocasionado por melanócitos transformados em células tumorais. No Brasil, sua frequência corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados e tem predominância em adultos de pele branca. Embora isto represente apenas 4% das neoplasias malignas de pele, o melanoma é considerado o mais agressivo devido a sua alta capacidade de metastática (INCA 2014).

A taxa de incidência do melanoma no Brasil é de 3,03 (homens) e 2,85 (mulheres) a cada 100 mil habitantes, sendo a região Sul do país a mais afetada por esta doença. O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se o diagnóstico e tratamento ocorrerem nos estágios iniciais; porém, quando já avançado, a sobrevida estimada é de 6-9 meses (INCA 2014).

Um dos tratamentos convencionais mais comum é realizado com dacarbazina (LENS; EISEN, 2000). Porém, este câncer possui uma taxa de resposta ao tratamento situada em torno de 5-20% (KIM *et al.*, 2010). A eficácia da quimioterapia é prejudicada pela resistência (intrínseca ou adquirida) do tumor. Este fenômeno é denominado ‘resistência a múltiplas drogas’ ou ‘resistência a múltiplos xenobióticos’ (MDR – *multi-drug resistance* ou MXR - *multi-xenobiotic resistance*) (LA PORTA, 2009).

Esta resistência pode surgir através de vários mecanismos distintos, incluindo alterações em “*checkpoints*” do ciclo celular, comprometimento das vias apoptóticas ou dos mecanismos de reparação de danos. Outro mecanismo recorrente é o aumento do efluxo de fármacos citotóxicos mediado por uma classe de transportadores dependentes de energia, conhecidos como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). Estes transportadores expulsam a droga do interior da célula, impedindo que ela acumule; desta forma, a droga não consegue atingir a concentração tóxica necessária para ocasionar a morte das células tumorais (GOTTESMAN; FOJO; BATES, 2002).

2.2.1 Linhagem de células B16F10

As células B16F10 foram isoladas a partir de melanoma de camundongo (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6J. São células epiteliais fusiformes e aderentes (Figura 1) com alta capacidade metastática (ATCC, 2014).

Estas células vêm sendo amplamente utilizadas em estudos *in vitro*. Possuem como característica alta capacidade de invasão e por isso também são empregadas como modelo de estudo de metástase *in vivo*, através da inoculação em camundongos (FIDLER, 1973; BOBEK *et al.*, 2010).

ATCC Number: **CRL-6475**™
Designation: **B16-F10**

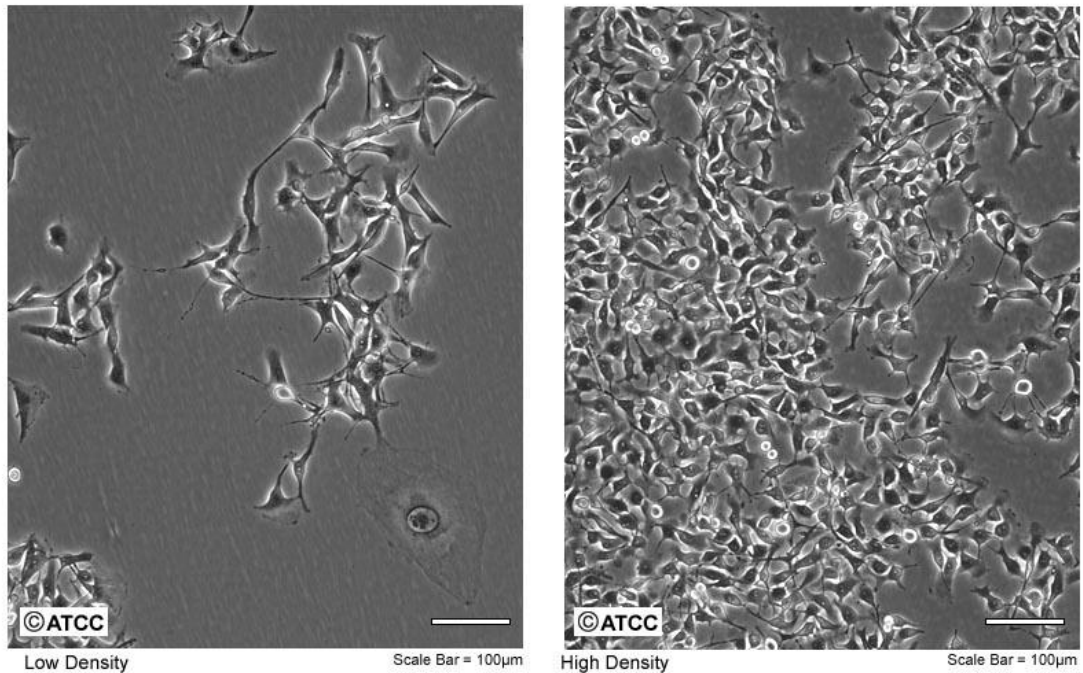


Figura 1 - Micrografia de células da linhagem B16F10 (ATCC, 2014).

3 PERGUNTA

A exposição a nanopartículas de ouro e prata é capaz de modular características importantes das células B16F10, como sobrevivência, proliferação, metabolismo e atividade de transportadores ABC, e assim interferir no prognóstico de pacientes com câncer do tipo melanoma?

4 HIPÓTESE

Nanopartículas de ouro e prata são capazes de atuar sobre células tumorais B16F10, e esta exposição afeta a malignidade das células tumorais ao torná-las resistentes ao estresse químico, podendo influenciar a progressão da doença.

5 JUSTIFICATIVA

Já existe uma grande discussão na comunidade acadêmica sobre o potencial carcinogênico de contaminantes ambientais. Decorrente disso, ao redor do mundo há uma busca desenfreada pelo desenvolvimento de métodos diagnósticos mais precisos e descoberta de agentes terapêuticos mais eficientes contra o câncer. Porém, não se pode negligenciar a situação de pacientes já acometidos pela doença, e que em muitos casos, não tem sucesso no tratamento devido a fatores pouco conhecidos (KIM *et al.*, 2010).

A ideia de que a exposição a contaminantes ambientais possa potencializar a agressividade do câncer é preocupante e relevante, já que isso pode atrapalhar o tratamento, favorecendo a progressão da doença. Também não deve ser ignorado o fato de que, da mesma forma em que ocorrem interações medicamentosas no organismo, a capacidade de alguns contaminantes interagirem com drogas não pode ser descartada (FARDEL; KOLASA; LE VEE, 2012), de modo que a exposição de pacientes a esses contaminantes poderia interferir no tratamento quimioterápico e afetar o prognóstico.

Essa é uma questão sem precedentes na literatura, que merece atenção. Ainda mais quando se trata de contaminantes emergentes como as nanopartículas, cujo potencial tóxico e comportamento em sistemas biológicos são pouco esclarecidos, porém já são largamente comercializados e considerados para possíveis aplicações biomédicas.

6 OBJETIVO GERAL

Investigar se as nanopartículas de prata e ouro exercem alguma influência sobre a malignidade das células de melanoma.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS E METAS

- Empregar a linhagem B16F10 como modelo de investigação dos efeitos das nanopartículas metálicas em células de melanoma murino.
- Verificar a viabilidade celular através do ensaio de Vermelho Neutro e Azul de Tripan.
- Verificar a citotoxicidade / metabolismo celular através de ensaio de MTT.
- Verificar a proliferação celular através do ensaio de cristal violeta.
- Avaliar a atividade de transportadores ABC envolvidos com o mecanismo de resistência a multidrogas (MDR).

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM B16F10

Alíquotas de células da linhagem B16F10 (Banco de Células do Rio de Janeiro) foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², com meio DMEM (*Dulbecco's Minimum Essential Medium*, pH 7,4; 4500 mg.l⁻¹ de glicose; 3700 mg.l⁻¹ de bicarbonato de sódio), esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm e suplementado com 10% de soro fetal bovino e estreptomicina (concentração final de 10 µg.ml⁻¹) e penicilina (10 U.ml⁻¹).

Para o crescimento e adesão, as células permaneceram em incubadoras a 37°C e pCO₂ de 5%, com trocas de meio realizadas a cada 48 h. No decorrer do processo de expansão das células, ocorreram as passagens para garrafas maiores (75 cm² e 150 cm²) ao atingirem cerca de 60 a 70% de confluência, até se obter a quantidade de células suficiente para o desenvolvimento dos experimentos.

Para obter as células em suspensão, é necessário dissociá-las da superfície da garrafa de cultivo. Para isso foi utilizada a solução enzimática de tripsina-EDTA (concentração 2 g.l⁻¹) por um período de 2 a 5 min – tempo geralmente suficiente

para que as células se soltem da superfície dos frascos de cultura. Em seguida, foi acrescentado meio de cultura suplementado com soro fetal bovino, a fim de inativar a ação enzimática. A suspensão foi subcultivada para uma nova garrafa de cultura, sendo adicionado meio de cultura.

Ao obter a quantidade de célula suficiente para a realização dos experimentos através do processo de expansão celular, realizou-se a dissociação enzimática, e através de uma câmara de *Neubauer*, as células foram contadas em um microscópio de luz invertido.

Após a quantificação das células, estas foram plaqueadas em microplacas de cultura de 96 poços, na razão de 8000 células por poço (número que fornece a quantidade de células necessárias para formação de uma monocamada no fundo do poço, sem amontoamento de células, até o dia da análise – 48 h após plaqueamento) onde repousaram durante 24 h até a realização da exposição às nanopartículas.

Todos os reagentes usados nos procedimentos foram pré-aquecidos em banho-Maria a 37 °C.

7.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

7.2.1 Síntese das nanopartículas

As NPs foram obtidas através da colaboração existente com pesquisador Arandi G. Bezzerra Jr. (Laboratório de Nanoestruturas para Sensores - LANSEN - Universidade Federal do Paraná). Estas NPs foram sintetizadas pelo método de ablação a laser em meio líquido, que permite a produção de nanoestruturas de forma rápida e com impacto ambiental reduzido, evitando a formação de resíduos, pois dispensa a utilização de reagentes químicos.

Esta técnica consiste na focalização de um feixe laser pulsado de alta potência na superfície de um alvo sólido com alto grau de pureza (Au e Ag neste

caso) imerso em solvente (água bidestilada estéril). O esquema da montagem experimental é exibido na Figura 2.

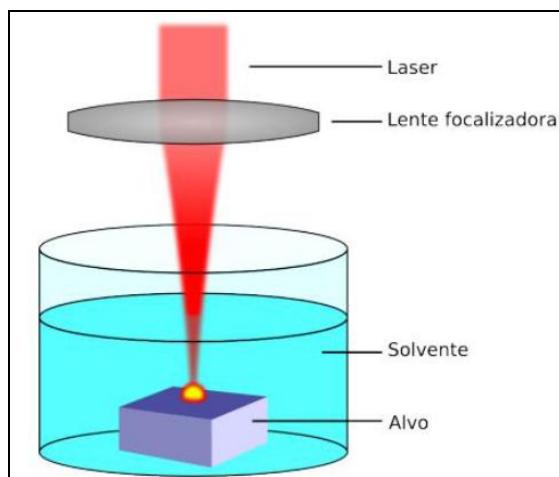


Figura 2. Esquema da montagem utilizada para realização da ablação a laser (Fonte: TEIXEIRA ROSA, 2014).

7.2.2 UV-Vis

A Espectroscopia Ultravioleta-visível (UV-Vis) é comumente utilizada para estudar a cinética de formação de NPs em solução bem como o tamanho das partículas. Essa metodologia fornece dados sobre a interação da luz com a amostra dentro da faixa do espectro que vai de 200 nm a 1025 nm.

Este método permite uma análise rápida quanto à quantidade, tamanho e polidispersidade das NPs. A análise dos resultados foi feita com base nos gráficos gerados a partir da aferição dos valores de absorbância máxima ($A_{\text{máx}}$), comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) e largura a meia-altura (FWHH, do inglês *full width at half-height*) (Figura 3). O valor de $A_{\text{máx}}$ está relacionado ao número de partículas formadas e FWHH (a largura do pico representado no gráfico) nos dá uma ideia da polidispersidade (LINK, S. & EL-SAYED, 1999). Já $\lambda_{\text{máx}}$ está relacionado ao tamanho das NPs, sendo que se observa um deslocamento para o vermelho deste valor com o aumento no tamanho das NPs (JAIN *et al.*, 2008). AgNPs e AuNPs coloidais possuem tipicamente uma coloração amarela e roxa respectivamente, que corresponde ao espectro resultante da absorção de fótons com comprimento de onda em torno de 400 nm (AgNP) e 520 nm (AuNP).

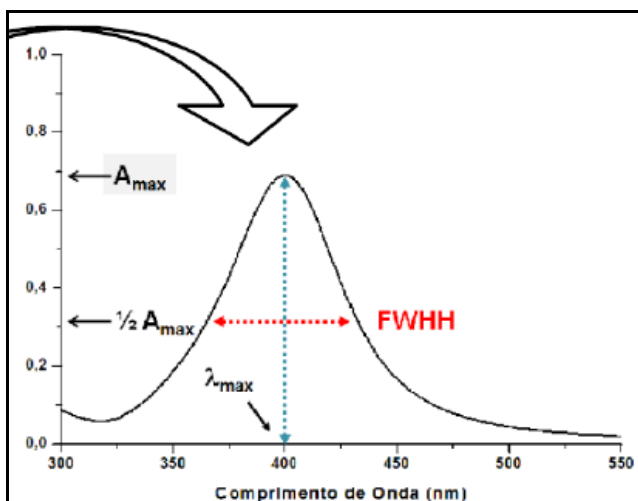


Figura 3 - Banda típica de Ag-NPs esféricas (**Fonte:** SIGNORI, 2010).

Inicialmente, é medido o espectro da luz transmitida pelo solvente, no qual as partículas foram produzidas, em uma cubeta de quartzo para que este sinal seja utilizado como referência. Então, é medido o espectro da luz transmitida através do coloide em estudo e a quantidade de luz absorvida é dada em termos da densidade óptica ou absorbância.

7.2.3 Espalhamento dinâmico de Luz – DLS

A medida do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) informa o tamanho das partículas suspensas em meio líquido (BERNE & PECORA, 2000). Nesta técnica, um laser incide sobre a amostra e a intensidade do feixe espalhado por um ângulo θ é medida ao longo do tempo.

4.9.4 Potencial zeta

O potencial zeta das nanopartículas em meio de cultura (meio de exposição às células) e em água (meio em que as nanopartículas estavam dispersas) foi caracterizado usando Zetasizer Nano® - Malvern no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, mediante colaboração com a pesquisadora Carmen Lúcia Voigt. O potencial zeta é uma

medida do poder de repulsão, atração eletrostática ou cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade de uma suspensão.

7.2.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O preparo das amostras para a análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET) foi realizado com o depósito de uma gota da solução coloidal em grades de cobre, previamente revestidas com uma fina película de carbono, onde a amostra foi deixada para secagem. As imagens foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica - CME/Universidade Federal do Paraná, no microscópio JEOL 1200EX-II, operando a 100 kV.

7.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Com base em concentrações previstas de AuNP e AgNP em água no ambiente de 0,14 e 0,01-0,03 ng.mL⁻¹, respectivamente (PÉREZ; LA FARRÉ; BARCELÓ, 2009), foram selecionadas 5 concentrações para AuNP e AgNP (0,01, 0,1, 1, 10 e 100 ng.mL⁻¹). Ao todo foram 10 grupos expostos as NP e mais um controle do experimento (meio de cultura com o volume de H₂O – 0,24% – correspondente ao volume da suspensão de NPs dos grupos expostos) e um controle do ensaio (controle negativo com 0,01% de saponina, nos ensaios de viabilidade/ metabolismo/ proliferação). O tempo de exposição escolhido foi de 24h.

Após estas definições, foram realizados três experimentos independentes com oito replicatas para cada grupo, para cada um dos seguintes ensaios.

7.4 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

7.4.1 Vermelho neutro

O teste de Vermelho Neutro (VN) é uma análise colorimétrica para quantificação de permeabilidade de membrana e atividade lisossômica de células. O

ensaio baseia-se na capacidade das células viáveis de incorporar e assimilar o reagente dentro dos lisossomos. O vermelho neutro é um corante catiônico fraco, que penetra prontamente na membrana celular e se acumula intracelularmente nos lisossomos, onde se combina com a parte aniônica da matriz lisossômica (SVENDSEN *et al.*, 2004).

Mudanças na superfície celular ou na membrana lisossômica levam a fragilidade lisossômica e outras alterações que se tornam gradativamente irreversíveis. Tais alterações ocorridas pela ação de xenobióticos resultam na diminuição da absorção e assimilação do Vermelho Neutro. Assim, é possível distinguir células viáveis de danificadas ou mortas, uma vez em que a quantidade de corante incorporado às células é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta (SVENDSEN *et al.*, 2004).

Após o período de exposição aos contaminantes o teste do vermelho neutro foi realizado para determinar a viabilidade celular. Os poços foram lavados com PBS estéril e a eles foram adicionados 200 μ l da solução de vermelho neutro (reagente diluído em meio de cultura numa concentração de 100 μ g.mL⁻¹). Após um período de incubação de 2h em estufa a 37°C e pCO₂ de 5%, os poços foram lavados 3 vezes com solução de formol (0,5% em água) e cloreto de cálcio (0,1%) para remoção do reagente não incorporado e fixação das células.

Em seguida, 300 μ l de solução de ácido acético a 1% e etanol a 50% foram adicionados para extração do corante. Após 15 min de repouso, o conteúdo dos poços foi homogeneizado para ressuspensão do corante. Por último, 200 μ l do sobrenadante foram transferidos para outra microplaca de 96 poços para quantificação da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

7.4.2 Azul de tripan

O princípio deste método é baseado na capacidade de células viáveis excluírem o corante vital azul de tripan do seu interior, diferenciando-as de células não viáveis, cuja integralidade da membrana plasmática foi perdida. Os danos na membrana permitem a difusão do corante para dentro das células, e estas podem

ser identificadas por ficarem coradas de azul. Já as células viáveis, bloqueiam a passagem do corante, e preservam a aparência refringente (PHILLIPS 1973; TORTORELLO 2014).

Findado o período de exposição aos contaminantes, o corante azul de tripan (0,04%, Sigma®) foi adicionado aos poços da microplaca, e após 1 min, foram capturadas imagens de três campos diferentes com auxílio de um microscópio invertido (objetiva de 20X). A análise foi feita a partir de imagens com um número mínimo de 100 células/imagem, para cada grupo experimental. A porcentagem de viabilidade foi determinada através da equação:

$$\frac{\text{número total de células} - \text{número de células coradas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

7.5 TESTE DE CITOTOXICIDADE / METABOLISMO MITOCONDRIAL - MTT

Este método baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem enzimaticamente o MTT (3 - [4,5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio) formando cristais de formazan, que possuem cor roxa característica ao serem dissolvidos em DMSO e podem ser quantificados por espectrofotometria. Sendo as desidrogenases mitocondriais responsáveis pela reação de redução, para que esta reação ocorra há a necessidade de que a célula esteja viável e suas mitocôndrias funcionais (REILLY *et al.*, 1998).

Decorrido o tempo de exposição, foram acrescentados 200 µl de solução de MTT em meio (concentração final 5 mg.ml⁻¹), seguindo para 3 h de incubação em estufa a 37 °C e pCO₂ de 5%. Logo após, todo meio contendo MTT foi removido, os poços foram lavados 2 vezes com PBS para remover restos de meio e do reagente. Os cristais formados foram dissolvidos em 100 µl de DMSO e foi determinada a absorbância em espectrofotômetro usando o comprimento de onda de 550 nm.

7.6 ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES DO SISTEMA DE RESISTÊNCIA A MULTIPLAS DROGAS (MDR)

O método de baseia no efluxo da rodamina-b pelos transportadores do sistema MDR, que atravessa a membrana plasmática de forma passiva, de modo que quanto maior a quantidade do fluoróforo dentro da célula, menor a atividade destes transportadores.

Após a exposição das células, o meio de cultura presente nos poços foi substituído por 200 µl de solução contendo 1 µM de rodamina B em meio de cultura para determinação das atividades da glicoproteína-P e MRP. Após período de 30 min de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS para garantir que restos de corante fossem removidos. Em seguida, foram adicionados 250 µl de PBS em cada poço e a placa foi levada ao congelador a -76 °C até que os poços fossem congelados por completo, para a ruptura das células.

Após descongelamento, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e 200 µl do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca preta. A intensidade de fluorescência foi mensurada em espectrofotômetro (λ de excitação = 485 nm; λ de emissão = 530 nm). Os procedimentos foram realizados evitando a exposição à luz para evitar perda de fluorescência (LIEBEL *et al.*, 2011).

7.7 PROLIFERAÇÃO CELULAR - CRISTAL VIOLETA

O cristal violeta (cloreto de pararosanilina) é um corante também conhecido como violeta de Genciana, capaz de ser absorvido pelas células em cultura. Este corante básico cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (GILLIES, DIDIER, DENTON, 1986; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Findado o tempo de exposição, o meio de cultura foi removido dos poços. Em seguida, os poços foram lavados uma vez com PBS a 37°C para remoção dos resquícios de meio. Adicionou-se 50 µl de paraformaldeído 4% (diluído em tampão cacodilato de sódio 0,02 M) em cada poço para fixação das células, e após isto, as células foram incubadas por 30 min em gelo. Terminada a incubação, o fixador foi

substituído por 100 μl de solução de cristal violeta ($0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$ em H_2O) em cada poço e novamente as células foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Após isto, a solução de cristal violeta foi removida, os poços foram lavados duas vezes com 150 μl de água destilada. Foram adicionados 100 μl de ácido acético 33% em cada poço para extração do corante e durante 30 min foram incubadas num agitador, a temperatura ambiente. Após isso, foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 570 nm.

7.8 TESTE DE INTERFERÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS SOBRE OS ENSAIOS

Através do ensaio UV-Vis, as nanopartículas são capazes de absorver luz em determinados comprimentos de ondas. ONG *et al.* (2014) demonstraram a interferência de várias nanopartículas em alguns ensaios toxicológicos *in vitro*, e que isto se deve pela característica intrínseca de algumas nanopartículas em absorver luz/fluorescer, ou pela capacidade destas interagirem com os analitos, atrapalhando a interpretação dos dados.

As análises de viabilidade, citotoxicidade, proliferação e atividade dos transportadores de efluxo baseiam-se em métodos colorimétricos/fluorimétricos. Sendo assim, para prevenção da interpretação errada dos dados, investigou-se a possível interferência das nanopartículas sobre os ensaios que empregam espectrofotometria e espectrofluorimetria.

Para isto, foi eleita a concentração de $1,0 \text{ ng.ml}^{-1}$. Assim, 200 μl da suspensão de NPs juntamente com os reagentes de cor (MTT, vermelho neutro e cristal violeta) ou fluoróforo (rodamina-b), foram incubadas por um período de tempo respectivo a cada uma das análises. Para comparação, foram estabelecidos 3 grupos controle: H_2O (veículo das nanopartículas), solução do corante/fluoróforo, e solução de AgNP e AuNP em água.

Após a incubação, foi realizada a leitura da absorbância/fluorescência nos comprimentos de onda correspondente a cada ensaio.

7.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram testados quanto a normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov (valor-p de Dallal-Wilkinson-Lilliefors) e analisados através da Análise de Variância de uma Via (one-way ANOVA), seguidos pelo pós teste de Dunnett's (para comparação dos grupos expostos *versus* controle).

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NPs

8.1.1 Aparência das nanopartículas

As soluções de AgNP e AuNP apresentaram coloração amarela e roxa respectivamente, desde a síntese, e foram capazes de conservar estas mesmas características, sem apresentar precipitados ou agregados por meses (avaliadas até 6 meses após a síntese). Isto certifica a qualidade e durabilidade do material produzido, o que é geralmente difícil assegurar quando se trabalha com nanopartículas.

8.1.2 UV-Vis

As soluções de nanopartículas de prata foram submetidas, logo após sua síntese, à leitura no equipamento UV-VIS e apresentou um pico de absorção em 400 nm das AgNPs e 519 nm das AuNPs (Figura 4), responsável pela coloração da solução coloidal. O fato de apresentarem apenas um pico de absorção indica que as partículas apresentam formato aproximadamente esférico (confirmadas pela MET – Figura 6).

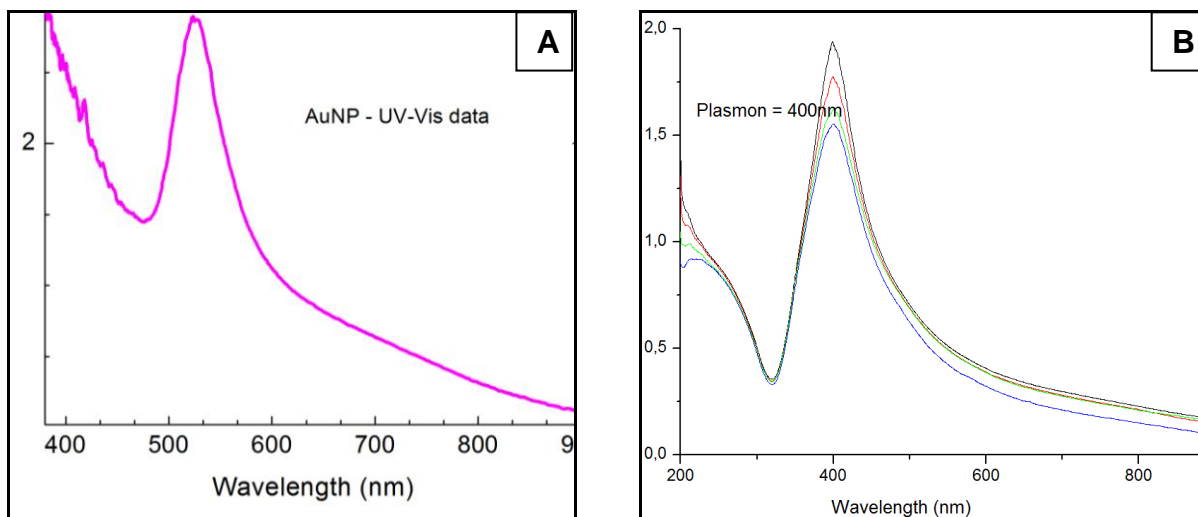


Figura 4. Espectro de absorção UV/Vis da amostra de AuNP (A) e AgNP (B) em água. Eixo “y” representa o número de partículas, e eixo “x” o comprimento de onda.

8.1.3 Espalhamento Dinâmico de Luz – DLS

As amostras de NPs apresentaram uma estreita distribuição de tamanho, com maior prevalência entre 1 nm e 2 nm, chegando até a 4 nm (Figuras 5 e 6). Estudos relatam que a toxicidade de nanopartículas é tamanho-dependente, sendo que quanto menor a nanopartícula, maior a sua toxicidade (PAN *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2014)

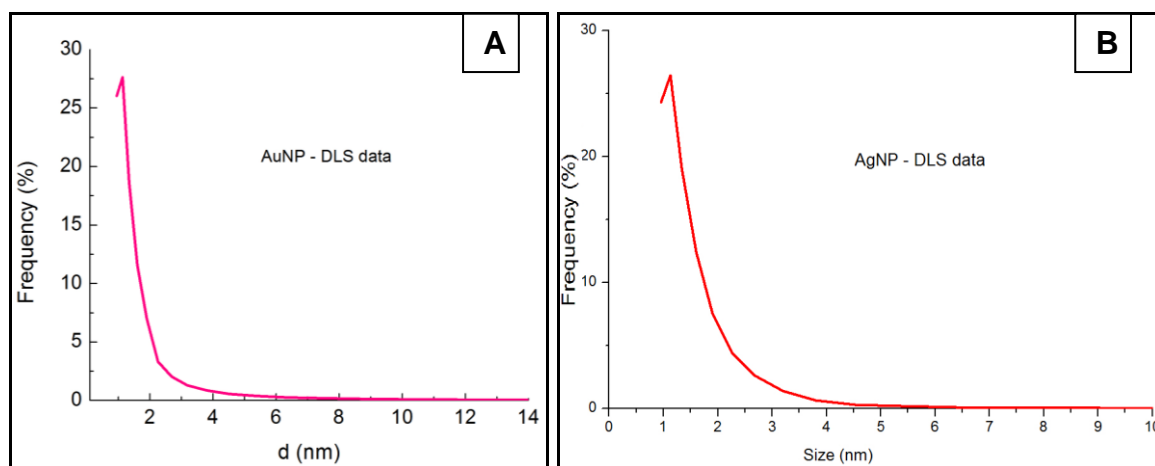


Figura 5. DLS de uma amostra de AuNPs (A) e AgNP(B). Partículas com tamanho entre 1 e 2 nm.

8.1.4 Potencial Zeta

Foi realizada a medida de potencial zeta das amostras de nanopartículas suspensas em H₂O, e o valor médio foi de aproximadamente -20 mV para AgNPs e de -22 mV para AuNPs. Também foi feita a medição das amostras suspensas em meio de cultivo celular e o valor médio do potencial zeta foi de -7,45 mV para AgNPs e -4,5 mV para AuNPs. Essa alteração no potencial zeta está relacionada com a presença de íons e eletrólitos do meio, que interferem na precisão da aferição.

O potencial zeta é um referencial que indica as condições de estabilidade da suspensão. Partículas em solução estão sujeitas a sofrer ionização ou adsorver grupos carregados em sua superfície. Valores de potencial zeta abaixo de -30 ou acima +30 mV indicam estabilidade do estado de dispersão das NP, devido à repulsão pelas cargas elétricas da superfície das nanopartículas. Já valores entre -30 e +30 mV indicam instabilidade da suspensão das NPs, com tendência à agregação. (MALVERN, 2009).

Considerando os presentes resultados, segundo o potencial zeta, as amostras de nanopartículas de ouro e prata demonstraram estar sujeitas a sofrer agregação, o que justifica achados de partículas maiores de 5 nm da MET (Figura 6).

8.1.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As análises das imagens de MET corroboram o resultado apresentado no tópico 8.1.3 revelando a presença de nanopartículas esféricas com diâmetro aproximado de 1 a 3 nm (Figura 6). Segundo a análise de Espalhamento Dinâmico de Luz, as partículas apresentariam tamanho de até 4 nm. Porém é possível notar alguns pontos onde são encontradas nanopartículas acima de 5 nm. É possível que estes pontos representem a formação de pequenos agregados, previstos pelo potencial zeta (Tópico 8.1.4) e vale a pena frisar que a MET foi realizada aproximadamente 5 meses após a síntese e realização dos ensaios *in vitro*.

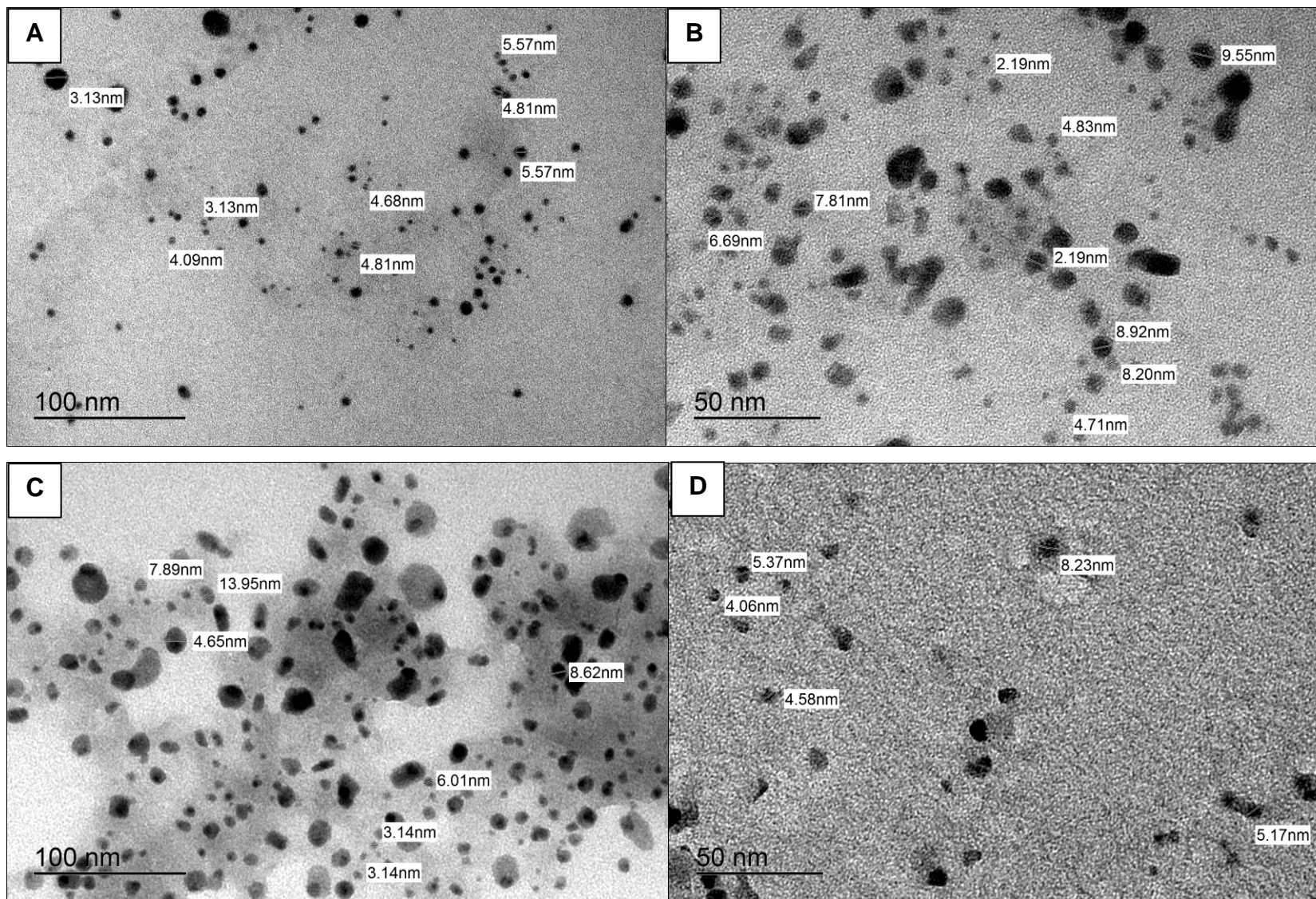


Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de amostras de AuNP (A e B) e AgNP (C e D). NPs esféricas com tamanhos <5nm . Pontos >5nm representam pequenos agregados de NPs.

8.2 TESTE DE INTERFERÊNCIA DAS NANOPARTÍCULAS SOBRE OS ENSAIOS

As soluções de nanopartículas foram testadas no comprimento de onda respectivo a cada um dos ensaios (cristal violeta, atividade dos transportadores de efluxo, MTT e vermelho neutro), bem como incubadas com o reagente inerente aos mesmos.

Foi realizada a comparação das amostras de 'AuNPs' e 'AgNPs' com o grupo controle ' H_2O ', e das amostras contendo 'NPs+reagente' com o grupo controle ' H_2O +reagente' (o qual continha volume de H_2O proporcional ao volume NPs das amostras 'NPs+reagente').

Em relação ao método de cristal violeta, a presença das nanopartículas de ouro e prata aumentaram o valor da absorbância em cerca de 6% quando comparadas com o grupo controle (Figura 7A). Estas também apresentaram efeito de supressão da absorbância no comprimento de onda da análise de MTT. A absorbância neste método foi reduzida 54% na presença de AgNPs e 45% quando AuNP (Figura 7C).

Quanto a interferência das NPs sobre a espectrofluorimetria do ensaio de Atividade dos Transportadores de Efluxo, apenas as AgNPs apresentaram efeito. Houve um aumento de 12% no valor da leitura da fluorescência da rodamina-b na presença dessas NPs (Figura 7B). Por sua vez, somente as AuNPs interferiram na absorbância do método de Vermelho Neutro, no qual foi observado um aumento de 6% (Figura 7D).

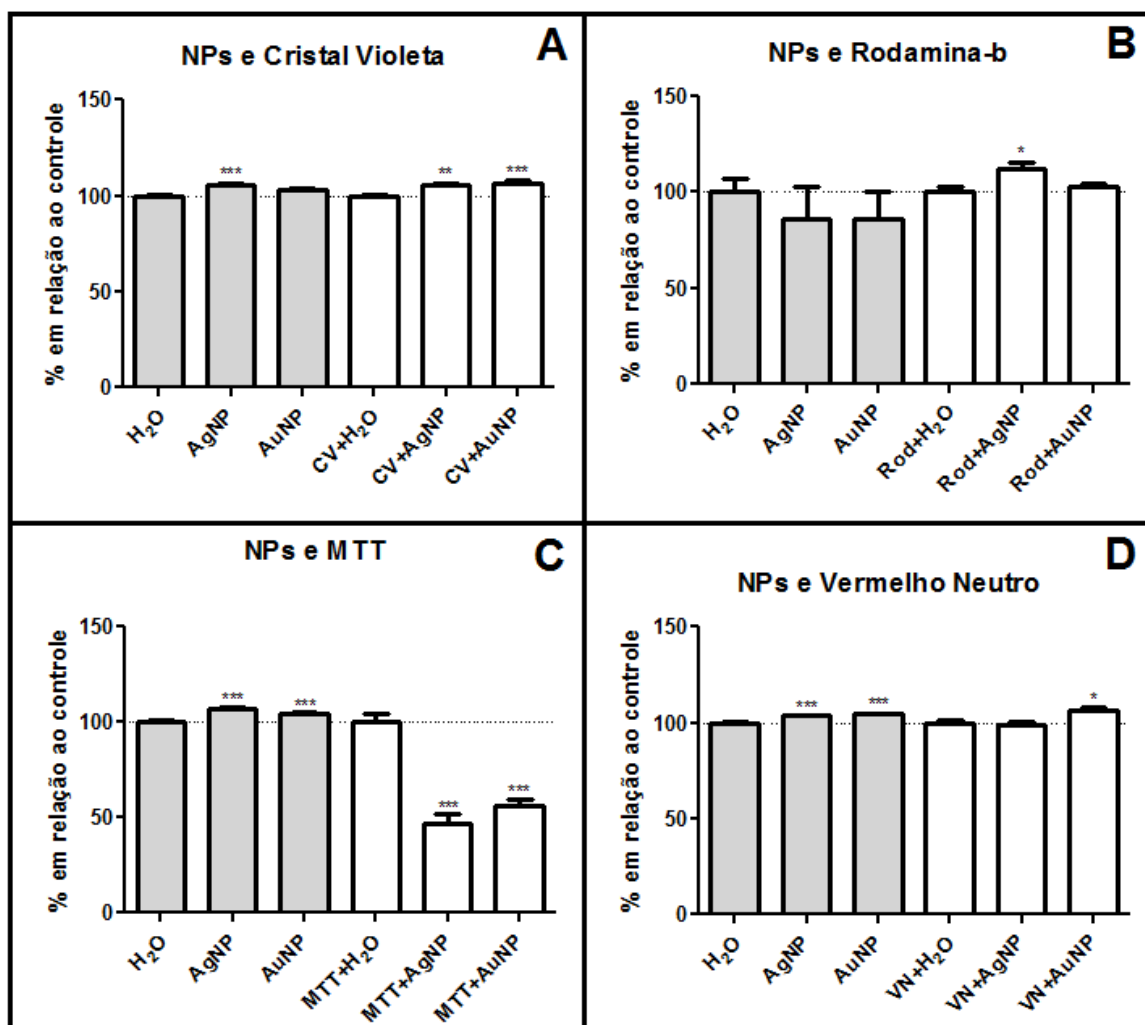


Figura 7. Interferência das NPs sobre os métodos de cristal violeta (A), atividade dos transportadores de efluxo (B), MTT (C) e vermelho neutro (D). Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle ('H₂O' para grupos representados por colunas cinza, e 'n+H₂O' para grupos representados por colunas brancas). *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

De fato, todas as análises revelaram sensibilidade à presença de pelo menos uma das NPs. Embora não seja possível afirmar a quantidade exata de NP que as células são capazes de internalizar, é admissível que a quantidade intracelular de NPs (que iriam, de fato, interferir nas respostas celulares e consequentemente nos métodos) seja muito inferior a presente em 200 μ l de suspensão a 1 ng.ml⁻¹.

A verdadeira implicância destes dados será discutida no tópico dos resultados respectivo a cada um dos ensaios, a seguir.

8.3 TESTES DE VIABILIDADE CELULAR

8.3.1 Vermelho neutro

Na análise de vermelho neutro, os grupos contendo as concentrações de 0,1 e 100 ng.mL⁻¹ de AgNPs apresentaram um aumento da viabilidade de 17% e 19% respectivamente, em relação ao controle. Da mesma forma, para as AuNPs o aumento foi de 15% (0,01 ng.mL⁻¹), 18% (0,1 ng.mL⁻¹) e 13,5% (1,0 ng.mL⁻¹) (Figura 8).

A interferência da AuNP sobre a absorbância, exibida no tópico '8.2.', não invalida estes resultados, uma vez que a proporção dos efeitos detectados foram mais expressivos do que o aumento de 6% na leitura causados pela AuNP (Figura 7). Além disso, as AgNPs (que não mostraram qualquer interferência sobre o método) também provocaram o mesmo padrão de resposta celular detectado nesta análise.

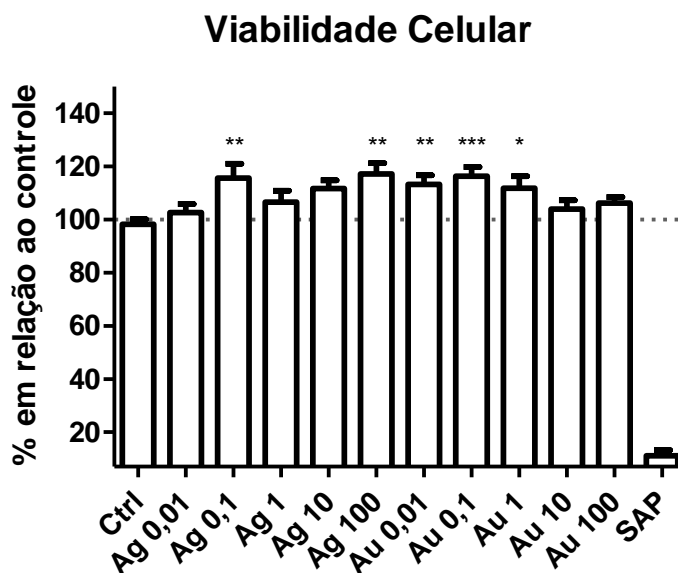


Figura 8 - Viabilidade celular após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (Ctrl). *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001.

Em um estudo com AuNP (20nm) estabilizadas com goma arábica, células CHO22 (linhagem de ovário de hamster chinês) apresentaram viabilidade celular intacta, mesmo após 24 h de exposição, em concentrações de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 140 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, porém não apresentaram aumento deste parâmetro, como observado no presente trabalho (VIJAYAKUMAR & GANESAN, 2012).

Ao contrário dos resultados aqui revelados, Grosse, Evje e Syversen (2013) observaram redução na incorporação do vermelho neutro em células endoteliais de cérebro de rato (RBE4), expostas por 24h a AgNPs (<10nm). Contudo, as concentrações utilizadas foram de 1, 10 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, bem maiores do que as deste estudo. Além disso, eles notaram que diferentes tempos de exposição, tamanhos e concentrações de AgNP provocam respostas celulares distintas, detectadas através desta análise.

8.3.2 Azul de tripan

Foi realizado o ensaio de azul de tripan, porém houve dificuldade quanto a aplicação deste método, nesta linhagem celular. Com a quantidade de células plaqueadas (8000 células por poço), ao final da exposição, as células atingem uma confluência em que se encontram muito próximas, e é inevitável que elas acabem se espalhando umas sobre as outras. Esta característica particular da linhagem B16F10 dificultou a visualização de cada célula individualmente, impossibilitando a contagem. Seria possível testar diferentes quantidades de células para o plaqueamento, a fim de escolher um número mínimo e viável, que permitisse a contagem das células na etapa final do experimento.

Tendo em vista a necessidade de adaptação do protocolo deste ensaio para a linhagem B16F10 e considerando o cronograma, foi decidido deixar esta padronização como uma perspectiva futura.

8.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE / METABOLISMO MITOCONDRIAL – MTT

As três maiores concentrações de AgNP e todas as concentrações de AuNP aumentaram (mais de 68%) a atividade metabólica mitocondrial em relação ao grupo não exposto (Figura 9).

A possibilidade de um resultado falso positivo provocado pela absorção de luz pelas NPs (verificada no teste de interferência das nanopartículas sobre o ensaio) foi excluída, uma vez em que, mesmo estas suprimindo a absorbância no comprimento de onda do teste (Figura 7C), as respostas celulares obtidas foram detectadas pelo significativo aumento da absorbância em relação ao controle.

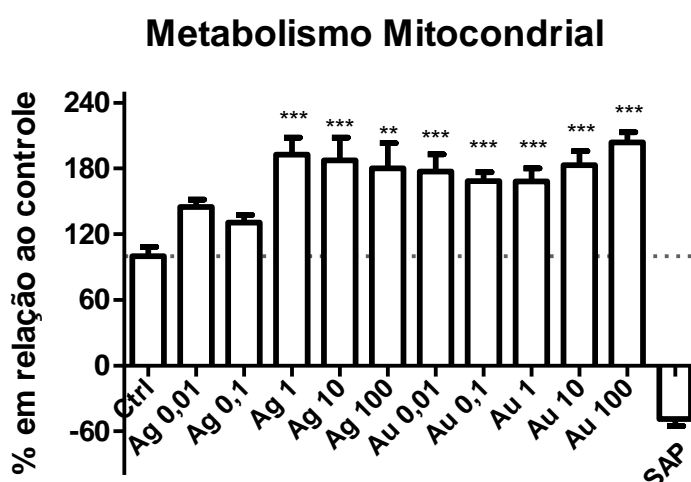


Figura 9 – Metabolismo mitocondrial após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média ± erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (Ctrl). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Corroborando com estes dados, Ahlberg *et al.* (2014) incubaram queratinócitos humanos HaCat com AgNP durante 42h, e as células apresentaram aumento do metabolismo mitocondrial, nas concentrações de 10 and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

AuNPs (50 mg.mL^{-1}) também foram capazes de aumentar a atividade metabólica de células A549 (linhagem de carcinoma pulmonar) após 24, 48 e 72h de exposição, porém este aumento foi apresentado apenas por AuNPs de 20 e 40 nm. As AuNPs de 10 nm não apresentaram diferenças estatísticas relevantes, e as de 5 nm foram citotóxicas, mais uma vez mostrando que os efeitos de nanopartículas são dependentes do tamanho e tipo celular (LIU *et al.*, 2014).

Sierra-Rivera *et al.* (2013) em estudos com AgNP (120nm) em células B16F10 detectaram através do teste de MTT efeitos citotóxicos concentração-dependentes, em concentrações de 7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 17.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As concentrações menores de 1,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não foram citotóxicas, tampouco aumentaram o metabolismo mitocondrial, não apresentando diferenças estatísticas em relação ao controle. O fato das NPs apresentarem respostas celulares diferentes ao deste trabalho, mesmo trabalhando com a mesma linhagem, pode ser devido à grande diferença no tamanho e da concentração das nanopartículas utilizadas.

8.5 ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO

A exposição às NPs, tanto de Ag quanto Au, não causou efeitos estatisticamente significativos na atividade dos transportadores de efluxo de drogas/xenobióticos em qualquer um dos grupos. Embora as AgNP tenham apresentado aumento da fluorescência em 12% no teste de interferência (Figura 7B), mesmo descontando esse valor o efeito ainda não seria estatisticamente relevante.

Atividade dos Transportadores de Efluxo

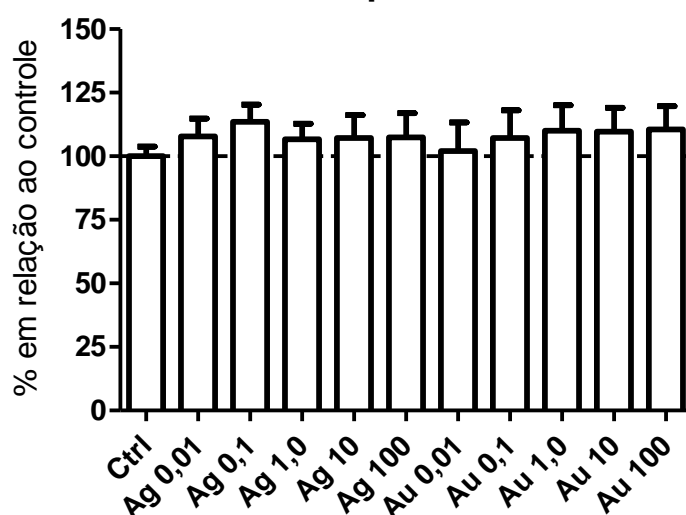


Figura 10 – Atividade dos transportadores de efluxo de drogas após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (Ctrl). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Embora os presentes dados não tenham revelado algum efeito, muito têm se investigado sobre as nanopartículas sobre o sistema MDR. Trabalhos que investigaram a conjugação de quimioterápicos à AuNP, a fim de otimizar a captação destas drogas, em linhagens MDR - resistentes à multidrogas (linhagem de células MCF-7/ADR, de câncer de mama; WANG *et al.* (2011) e linhagem de hepatocarcinoma HepG2R; GU *et al.* (2012)), com resultados promissores. Os quimioterápicos associados às nanopartículas conseguiram superar o sistema MDR e foram capazes de aumentar a concentração intracelular da droga em relação à administração da droga livre (DREADEN *et al.*, 2012).

Quanto às AgNPs, tradicionalmente têm sido reconhecidas pelo seu potencial microbicida (SWATHY *et al.*, 2014; VAN PHU *et al.*, 2014). Porém, estas nanopartículas também têm se mostrado eficientes no combate a bactérias que desenvolvem resistência a antibióticos. Não somente elas têm atividade microbicida intrínseca, como também atuam de forma sinérgica quando conjugadas a antibióticos, sendo capazes de subverter o sistema MDR, sendo mais eficazes do que o antibiótico ou a própria nanopartícula separados (BROWN *et al.*, 2012).

Brown *et al.* (2012) investigaram a ação de AgNP e AuNPs. AuNPs não apresentaram propriedades microbicidas intrínsecas como as AgNPs, porém, quando funcionalizadas com ampicilina, ambas NPs apresentaram amplo espectro de ação, contra bactérias gram-negativas e gram-positivas.

8.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os grupos respectivos as duas concentrações mais altas de AgNP e as quatro mais altas de AuNP apresentaram taxas de 13 a 25% de redução na proliferação celular (Figura 11).

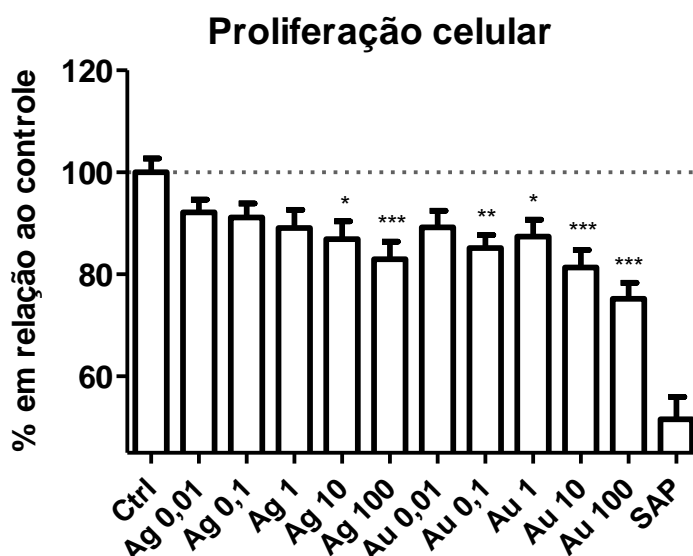


Figura 11 – Proliferação celular após 24h de exposição sob diferentes concentrações de AgNP e AuNP. Média \pm erro padrão. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle (Ctrl). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Segundo achados de Liu *et al.*, (2014) em células A549 e 95D, nanopartículas de ouro de 5 nm inibiram a proliferação celular, aumentaram o número de células apoptóticas e estacionaram a célula na fase G0/G1 do ciclo celular. Estes efeitos não foram observados quando AuNPs de maiores diâmetros foram utilizadas.

Nanopartículas de ouro também inibiram a proliferação de células endoteliais de veia umbilical humana e reduziu os níveis de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) em cultura, apresentando efeito antiangiogênico (PAN *et al.*, 2014).

De modo semelhante, AshaRani, Hande & Valiyaveetil (2009) em experimentos utilizando AgNPs sobre fibroblastos humanos (IMR-90) e células de glioblastoma humano (U251), observaram que a exposição resultou na inibição da proliferação celular, além de apresentarem anormalidades cromossômicas.

8.7 NANOPARTÍCULAS E O MELANOMA

Embora estes resultados revelem aumento da viabilidade celular e do metabolismo mitocondrial – o que em um primeiro momento nos leva a pensar que a exposição às NP esteja tornando estas células cancerosas mais resistentes e ativas, é visto que elas sofrem redução em sua taxa de proliferação.

Mais análises específicas são necessárias para compreender as respostas desta linhagem. Porém, a exposição das NPs às células B16F10 podem ter causado, a princípio, um estresse inicial que tenha aumentado a atividade mitocondrial e lisossomal. Entretanto este estresse prejudicou um dos parâmetros importantes na progressão do processo cancerígeno, que é a taxa de proliferação celular.

Se fosse possível extrapolar essa situação para um modelo *in vivo*, seria esperado que a exposição às nanopartículas reduzissem a taxa de progressão do tumor. Ainda que esta possibilidade contrarie as expectativas iniciais, estes resultados trazem novas perspectivas para estudos e aplicações de extrema importância destas nanopartículas na área biomédica.

9 CONCLUSÕES

Pela característica intrínseca das nanopartículas de absorverem luz, foi visto que elas podem ser detectadas pelos comprimentos de onda empregados nas presentes análises. Contudo, a magnitude das respostas celulares apresentadas sobrepôs possíveis ‘falsos positivos’.

A exposição das células B16F10 às AgNPs e AuNPs causou aumento na viabilidade celular e no metabolismo mitocondrial. Entretanto, a proliferação celular foi afetada, apresentando taxas menores em relação ao controle. A atividade dos transportadores de efluxo não foi alterada pela exposição.

Contudo, pelo fato das NPs alterarem esses parâmetros, o efeito das NPs como contaminantes ambientais ainda não pode ser excluído e mais trabalhos são necessários para maior esclarecimento destas respostas celulares.

REFERÊNCIAS

AHLBERG, S.; MEINKE, M. C.; WERNER, L.; EPPLE, M.; DIENDORF, J.; BLUME-PEYTAVI, U.; LADEMANN, J.; VOGT, A.; RANCAN, F. Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. vol. 88, p. 651–657, 2014.

ARORA, S; JAIN, J; RAJWADE, J M. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. **Toxicology letters**, v. 179, n. 2, p. 93–100, 2008.

ASHARANI, P.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETTIL, S. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. **BMC Cell Biology**. 10:65, 2009.

ASTM Standard E 2456-06, 2012. Standard Terminology Relating to Nanotechnology **ASTM International**, West Conshohocken, PA, 2012, DOI: 10.1520/E2456-06R12. Disponível em <<http://www.astm.org/Standards/E2456.htm>> Acesso em: 13 mai. 2014.

ATCC. **American Type Culture Collection**. 2014. Disponível em <<http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx>> Acesso em: 13 mai. 2014.

BERNE, B. J.; PECORA, R. Dynamic Light Scattering: With applications to Chemistry, Biology and Physics. **Dover Publications**, 2000.

BEYER, J. **Fish biomarkers in marine pollution monitoring: evaluation and validation in laboratory and field studies**. Tese acadêmica, Universidade de Bergen, Noruega. 1996.

BOBEK, V.; KOLOSTOVA, K.; PINTEROVA, D.; KACPRZAK, G.; ADAMIAK, J.; KOLODZIEJ, J.; BOUBELIK, M.; KUBECOVA, M.; HOFFMAN, R. M. A Clinically Relevant, Syngeneic Model of Spontaneous, Highly Metastatic B16 Mouse Melanoma. **Anticancer Research**. v.30, p. 4799-4804, 2010.

BROWN, A. N.; SMITH, K.; SAMUELS, T. A.; LU, J.; OBARE, S. O.; SCOTT, M. E. Nanoparticles Functionalized with Ampicillin Destroy Multiple-Antibiotic-Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.78, n.8, p. 2768–2774, 2012.

BRUNDLE, C. R.; EVANS, C. A.; WILSON, S. **Encyclopedia of materials characterization**. Butterworth-Heinemann, 1992.

COLMAN, B. P.; ESPINASSE, B.; RICHARDSON, C. J.; *et al.* Emerging Contaminant or an Old Toxin in Disguise? Silver Nanoparticle Impacts on

Ecosystems. **Environmental science & technology**, v. 48, n.9, p. 5229–5236, 2014.

DREADEN, E. C.; AUSTIN, L. A.; MACKEY, M. A.; EL-SAYED, M. A. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. **Therapeutic Delivery**, vol.3, n.4, p. 457–478, 2012.

EPA, 2007. Nanotechnology White Paper. US Environmental Protection Agency Report EPA 100/B-07/001, Washington. Disponível em: <http://www.epa.gov/>.

FARDEL, O.; KOLASA, E.; LE VEE, M. Environmental chemicals as substrates, inhibitors or inducers of drug transporters: implication for toxicokinetics, toxicity and pharmacokinetics. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. v.8, n.1, p. 29-46, 2012.

FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, 1973.

GAO, Y.; LUO, Z.; HE, N.; *et al.* Metallic nanoparticle production and consumption in China between 2000 and 2010 and associative aquatic environmental risk assessment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 6, p. 1681, 2013.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**. vol. 159, cap.1, p.109–113, 1986.

GOTTESMAN, M. M.; FOJO, T.; BATES, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 48–58, 2002.

GRANMAYEH RAD, A.; ABBASI, H.; AFZALI, M. H. Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. **Physics Procedia**, v. 22, p. 203–208, 2011.

GROSSE S., EVJE L., SYVERSEN T. Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. **Toxicology in Vitro**. vol. 27, cap.1, p. 305–313, 2013.

GU, Y. J.; CHENG, J.; MAN, C. W.; WONG, W. T.; CHENG, S. H. Gold-doxorubicin nanoconjugates for overcoming multidrug resistance. **Nanomedicine**. vol.8, n.2, p. 204-11, 2012.

INCA – Associação Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de Câncer de Pele: Melanoma. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma>. Acesso em 13 mai. 2014.

JAIN, P.K.; HUANG, X.; EL-SAYED, I. H.; EL-SAYED, M. A. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and the Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology and Medicine. **Accounts of Chemical Research**, v.41, n.12, p. 1578–1586, 2008.

KHAN, M. S.; VISHAKANTE, G. D; SIDDARAMAIAH H. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 199-200, p. 44–58, 2013.

KIM, C; LEE, C. W.; KOVACIC, L. *et al.* Long-term survival in patients with metastatic melanoma treated with DTIC or temozolomide. **Oncologist**. v.15, p. 765–771, 2010.

LA PORTA, C. A. M. Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma. **Current cancer drug targets**, v. 9, n. 3, p. 391–7, 2009.

LENS, M.B.; EISEN, T. G. Systemic chemotherapy in the treatment of malignant melanoma. **Expert Opin Pharmacother.**; v.4, n.12, p. 2205- 11, 2003.

LIEBEL, S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA, R. C.; *et al.* Cellular responses of *Prochilodus lineatus* hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 7, p. 1493–500, 2011.

LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.103, n.21, p. 4212. 1999.

LIU, Z.; WU, Y.; GUO, Z.; LIU, Y.; SHEN, Y. *et al.* Effects of Internalized Gold Nanoparticles with Respect to Cytotoxicity and Invasion Activity in Lung Cancer Cells. **PLoS ONE**. vol.9, n.6., 2014

LIU, W.; WU, Y.; WANG, C.; *et al.* Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319–30, 2010.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environ. Poll.**, v.150, p.5-22, 2007

MALVERN; Dynamic Light Scattering: an introduction in 30 minutes. **Technical note**. 2009.

ONG KJ, MACCORMACK TJ, CLARK RJ, EDE JD, ORTEGA VA, *et al.* Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. **PLoS ONE** vol. 9, n.3, 2014.

PAN, Y.; NEUSS, S.; LEIFERT, A.; *et al.* Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. **Small**, v. 3, n. 11, p. 1941–9, 2007.

PAN, Y.; WU, Q.; LIU, R.; SHAO, M.; PI, J.; ZHAO, X.; QIN LI. Inhibition effects of gold nanoparticles on proliferation and migration in hepatic carcinoma-conditioned HUVECs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. vol.24, cap.2, p. 679–684, 2014.

PÉREZ, S.; LA FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. **Trends in Analytical Chemistry**. v.28, n.6, 2009.

PHILLIPS H. J. Dye exclusion test for cell viability, In PF Kruse Jr&MK Patterson Jr (eds), *Tissue Culture Methods and Applications*, **Academic Press**, New York, p. 406-408, 1973.

RAVINDRAN, A.; CHANDRAN, P.; KHAN, S. S. Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 105, p. 342–52, 2013.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M.; *et al.* Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical pharmacology**, v.55, n.6, p. 803–10, 1998.

REJMAN, J.; OBERLE, V.; ZUHORN, I. S.; *et al.* Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. **The Biochemical journal**, v. 377, n. 1, p. 159–69, 2004.

SIERRA-RIVERA, C. A.; FRANCO-MOLINA, M. A.; MENDOZA-GAMBOA, E.; ZAPATA-BENAVIDES, P.; TAMEZGUERRA, R. S; RODRÍGUEZ-PADILLA, C. Potential of colloidal or silver nanoparticles to reduce the growth of B16F10 melanoma tumors. **African Journal of Microbiology Research**. Vol. 7(22), p. 2745-2750, 2013.

SIGNORI, A. M. **Desenvolvimento de uma nova metodologia para preparação de nanopartículas de prata estabilizadas pela Polietilenoimina funcionalizada e aplicação em catálise**. Dissertação de mestrado em química, Brasil, 2010.

SVENDSEN, C; SPURGEON, D.J; HANKARD, P.K; *et al.* A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, n.1, p. 20–29, 2004.

SWATHY, J. R.; SANKAR, M. U.; CHAUDHARY, A.; AIGAL, S.; ANSHUP & PRADEEP, T. Antimicrobial silver: An unprecedented anion effect. **Scientific Reports**. Vol.4, p.7161.

TEIXEIRA ROSA, R.G. **Caracterização de nanopartículas de Bi produzidas por ablação a laser**. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade federal do Paraná, Brasil, 2014.

THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. Disponível em <<http://www.nanotechproject.org/>> Acesso em 13 mai. 2014.

TORTORELLO, M.L.. Total Viable Counts – Microscopy. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Segunda Edição. p. 618–620, 2014.

VAN PHU, D.; QUOC, L. A.; DUY, N. N.; LAN, N. T. K.; DU, B. D.; LUAN, L. Q. & HIEN, N. Q. Study on antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized by

gamma irradiation method using different stabilizers. **Nanoscale Research Letters**, v.9, n.1, p. 162, 2014.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v.54, p. 10–4, 2011.

VIJAYAKUMAR, S.; GANESAN, S. In Vitro Cytotoxicity Assay on Gold Nanoparticles with Different Stabilizing Agents. **Journal of Nanomaterials**, vol. 2012, 2012.

WANG, F.; WANG, Y. C.; DOU, S.; XIONG, M. H.; SUN, T. M.; WANG, J. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. **ACS Nano**. vol.5, n.5, p. 3679-92, 2011.

WEB OF SCIENCE. Thomson Reuters. Versão 5.13.2. Disponível em <<http://apps.webofknowledge.com/>>. Acesso em 13 mai. 2014.